

## Recombined pure herpes virus built by using adhesive particles as basis and use thereof

**Patent number:** CN1234441

**Publication date:** 1999-11-10

**Inventor:** WU XIAOBING (CN); WU ZHIJIAN (CN); DONG XIAOYAN (CN)

**Applicant:** STATE MAJOR LAB OF VIRUS GENET (CN)

**Classification:**


**- International:** **A61K39/245; A61P31/22; C12N7/01; A61K39/245; A61P31/00; C12N7/01; (IPC1-7): C12N7/01; A61K39/245**

**- european:**

**Application number:** CN19981001753 19980504

**Priority number(s):** CN19981001753 19980504

**Also published as:**

 CN1120238C (C)

[Report a data error here](#)

### Abstract of CN1234441

The present invention describes a method for simply, conveniently and efficiently producing recombinant simple herpesvirus by using five cosmids (cos6, cos28, cos14, cos56 and cos48) containing HSV1 hologenome as basis. It includes the following steps: making the cosmid containing exogenous gene implement isomolar mixing with with other four cosmids,through PacI restriction, cotransfecting the cell sensitive to HSV-1 infection, and utilizing homologous recombination of five HSV fragments to produce the recombinant simple herpesvirus containing exogenous gene. According tot his method, the simple herpesvirus HSV1-lacZ100 capable of expressing colibacillus lacZ gene is produced, and its application includes: 1. it can be used as tracer for researching nerve conduction; 2) it can be used as target virus of medicine resisting simple herpesvirus and other antiviral medicine;and 3). can be used as auxiliary virus for HSV1 amplicon carrier research to flexibly monitor the titre change of auxiliary virus.

Data supplied from the [esp@cenet](mailto:esp@cenet) database - Worldwide

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl<sup>6</sup>

## [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 98101753.3

C12N 7/01  
A61K 39/245  
//C12N7/01, C12R1:  
91

[43]公开日 1999 年 11 月 10 日

[11]公开号 CN 1234441A

[22]申请日 98.5.4 [21]申请号 98101753.3

[71]申请人 病毒基因工程国家重点实验室

地址 100052 北京市宣武区迎新街 100 号朱丽辉

[72]发明人 吴小兵 伍志坚 董小岩 侯云德

权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图页数 0 页

[54]发明名称 以粘粒为基础构建重组单纯疱疹病毒及其用途

[57]摘要

本发明叙述了一种以含有 HSV1 全基因组的 5 个粘粒(cos6, cos28, cos14, cos56, cos48)为基础的简便而高效地产生重组单纯疱疹病毒的方法。将含有外源基因的粘粒与其余 4 个粘粒等摩尔混合,经 PacI 酶切后共转染对 HSV-1 感染敏感的细胞,通过 5 个 HSV 片段的同源重组而产生含有外源基因的重组单纯疱疹病毒。依照这种方法,产生了能表达大肠杆菌 lacZ 基因的单纯疱疹病毒 HSV1-lacZ100。HSV1-lacZ100 的用途有:1)作为研究神经传导的示踪剂;2)作为抗单纯疱疹病毒药物及其它抗病毒药物的靶病毒;3)作为 HSV1 扩增子载体研究中的辅助病毒以更灵敏地监测辅助病毒滴度变化。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种用于产生重组单纯疱疹病毒的方法, 由以下步骤组成:
  - (1) SetC 为一套含有 HSV1 17 株全基因组 DNA 的 5 个重组粘粒。由 cos6, cos28, cos14, cos56 及 cos48 组成。
  - (2) 将外源基因 X 表达盒 DNA 片段的两端加 XbaI 接头, 插入重组粘粒 cos56 的单一 XbaI 位点中构成 cos56-X。将 cos6, cos28, cos14, cos56-X 及 cos48 5 个粘粒的组合命名为 Set X。
  - (3) 将 Set X(5 个粘粒摩尔量相等)DNA 经 PaeI 酶切后, 用脂质体方法共转染 HSV 敏感细胞, 被导入的 5 个片段在细胞中发生同源重组而生成重组病毒 HSV1-X 毒种。
  - (4) 将得到的毒种进行空斑筛选和纯化, 获得重组病毒 HSV1-X。
2. 根据权利要求 1, 将外源基因表达盒插入 cos6 的 XbaI 位点中, 与其余 4 个粘粒或其改构体组合共转染细胞而产生的重组 HSV 病毒。
3. 构建了含有 CMV-lacZ-polyA 表达盒的重组质粒 pCMV-lacZ-polyA。其中 CMV 为人巨细胞病毒的立早启动子, lacZ 为大肠杆菌  $\beta$ -半乳糖苷酶基因, polyA 为 SV40 病毒小 t 抗原内含子和加尾信号。用 XbaI 酶切可将 4.3kb 的 CMV-lacZ-polyA 片段切出。
4. 根据权利要求 1 和 2, 产生一种表达大肠杆菌  $\beta$ -半乳糖苷酶的重组单纯疱疹病毒 HSV1-lacZ100。由以下步骤组成:
  - (1) 将大肠杆菌 lacZ 基因表达盒插入 cos56 中 XbaI 位点构建成 cos56-CMV-lacZ-polyA。将重组粘粒 cos6, cos28, cos14, cos48 及 cos56-CMV-lacZ-polyA 5 个粘粒组合命名为 Set-lacZ。
  - (2) Set-lacZ DNA 共转染 BHK 细胞, 获得表达大肠杆菌  $\beta$ -半乳糖苷酶的重组单纯疱疹病毒 HSV1-lacZ100 毒种。
  - (3) HSV1-lacZ100 毒种经空斑纯化后在 BHK 细胞中可稳定传代及大量扩增。
5. 根据权利要求 1, X 可换成任何表达其它外源基因的 DNA 片段。
6. 根据权利要求 4, HSV1-lacZ100 病毒可作为靶病毒用作筛选和评价抗单纯疱疹病毒的药物及其它广谱抗病毒药物。
7. 根据权利要求 4, HSV1-lacZ100 病毒可用作动物体内神经传导研究的示踪剂。
8. 根据权利要求 3, cos56-CMV-lacZ-polyA 可与 cos6, cos28, cos14, cos48 的改建体形成组合产生新的重组病毒, 达到用大肠杆菌  $\beta$ -半乳糖苷酶的活性监测新生成重组病毒的目的。

# 说明书

## 以粘粒为基础构建重组单纯疱疹病毒及其用途

本发明涉及一种以粘粒为基础构建重组单纯疱疹病毒的简便而高效的方法,及用这种方法构建的重组单纯疱疹病毒 HSV1-lacZ100 及其用途。

构建有感染性的单纯疱疹病毒载体的策略有二:无需辅助病毒的重组型病毒策略和依赖于辅助病毒的“微”(“mini”)病毒策略。前者是基于对整个病毒基因组的操作,将目的基因插入病毒基因组中,构建成重组病毒型单纯疱疹病毒;后者基于对复制及包装成感染性病毒颗粒所必需的病毒最基本顺式元件的认识和应用,构建成重组质粒型单纯疱疹病毒载体。可以把后者看成是前者的一种极端的例子。

由于单纯疱疹病毒基因组十分庞大(约 152kb),因而难以通过对基因组进行直接操作而插入外源基因。至今构建重组 HSV 病毒的最常见方法有 2 种:1) 将外源基因表达单位插入克隆于质粒中的 HSV 胸苷激酶基因(HSV tk)中,用此质粒与 HSV-1 基因组 DNA 共转染敏感细胞(如 vero 或 BHK 细胞),利用外源基因表达单位两侧的 tk 基因序列与 HSV-1 DNA 中的相应序列发生同源重组而产生重组 HSV 病毒。利用 tk 基因的负筛选作用(如用核苷类似物 ganciclovir)筛选重组病毒。这种方法获得的重组 HSV 病毒中,外源基因表达单位插在 tk 基因中。2) 克隆 HSV-1 基因组中的其它基因片段,在其中插入报告基因如 lacZ 基因表达单位,与 HSV-1 基因组 DNA 在细胞中进行同源重组产生重组 HSV 病毒。利用报告基因产物的呈色反应挑选出重组病毒。

以上两种方法都存在重组率低、背景高(即产生野生型病毒多)的缺点,导致重组病毒的筛选效率低并且过程繁琐。

本发明的目的是建立一种高效而快速获得重组 HSV 病毒的新方法。为此设计了一种利用含有 HSV-1 17 株全基因组的粘粒来构建重组 HSV 病毒的策略。本发明的优点在于,将 HSV-1 庞大的基因组“化大为小”,实现了 HSV 基因组的可操作性;不需要与野生型 HSV-1 基因组 DNA 共转染,从而降低了背景,理论上获得含有外源基因的重组病毒的概率应达到或接近 100%。用该方法我们成功地获得了能表达 lacZ 基因的重组单纯疱疹病毒 HSV1-lacZ100,实际重组概率在 50% 以上。

本发明的 HSV1-lacZ100 重组病毒的特征是在 HSV-1 17 株病毒基因组的 UL44 基因的 XbaI 位点中插入了长约 4.3kb 的 lacZ 基因表达单位 CMV-lacZ-polyA。

用于本发明的原始材料有以下几种:

Set C 粘粒: 包含 cos6,cos28,cos14, cos56, cos48 共 5 个粘粒。这套粘粒为 Davison AJ 提供 (Conningham C, Davison AJ. A cosmid-based system for constructing mutants of herpes simplex virus type 1. Virology, 1993, 197: 116-124)。

tgCMV-HyTK: (Lupton SD., Brunton, LL., Kalberg VA. and Overell RW. Dominant positive and negative selection using a hygromycin phosphotransferase-thymidine kinase fusion gene. Mol. Cell Biol. 1991, 11: 3374-3378)

pSV- $\beta$ -Galactosidase: Promega 公司, # E1081

本发明的 HSV-lacZ100 的构建过程如下:

#### 1. pCMV-lacZ-polyA 质粒的构建

polyA 片段, 插入 pCMV-HyTK 质粒(用 HindIII 和 BamHI 切去 154bp 的 polyA) 的相应位点中构成中间质粒 pCMV-HyTK-lacZ-polyA; 再用 NheI 和 Hind III 双酶切该中间质粒以去除 2.1kb 的 HyTK 基因, 补平末端后自连构成 pCMV-lacZ1; 用 XhoI 和 BamHI 切该质粒, 末端补平后加 XbaI linker(8 mer), 经 XbaI 酶切后相连, 构建成 pCMV-lacZ-polyA。用 XbaI 酶切可将 4.5kb 的 CMV-lacZ-polyA 表达盒切出。含有该质粒的菌种命名为 E.coli DH5  $\alpha$  /pCMV-lacZ-polyA。

#### 2. cos56-lacZ 的构建

将两端加有 XbaI 位点的 CMV-lacZ-polyA 片段插入 cos56 的 XbaI 位点中, 构建成 cos56-lacZ。利用粘粒 cos56 中的 HSV-1 片段在 UL44 基因中含有单一 XbaI 酶切位点的特点, 将上述 4.5kb 的 CMV-lacZ-polyA 片段与用 XbaI 线性化的 cos56 相连, 转化 MAX Efficiency DH5  $\alpha$  (GIBCO BRL 公司产品) 感受态菌, 涂布于含有 X-gal 及 IPTG 的 amp<sup>+</sup> 平板上, 挑取兰色菌落提取重组质粒, 用 XbaI 酶切鉴定。XbaI 酶切鉴定结果表明 4.5kb 的 CMV-lacZ-polyA 片段已成功地插入到 cos56 的 XbaI 位点中(插入方向未鉴定)。该位点位于 HSV-1 UL44 基因中, 该基因编码 HSV-1 糖蛋白 C (gC), 对于 HSV-1 在培养细胞中的感染和产毒性复制不是必需的。

#### 3. 5 个粘粒共转染 BHK 细胞

将 cos6, cos28, cos14, cos56-lacZ, cos48 等量混合, 用 PacI (Biolab) 酶切过夜, 依次用酚、酚/氯仿及氯仿抽提, 乙醇沉淀 DNA, 12000rpm 离心 10 分钟, 弃尽上清, 将 DNA 沉淀溶于适量无菌 TE 液中, 使总 DNA 浓度达到约  $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。取  $10 \mu\text{l}$  上述 DNA 溶液及  $20 \mu\text{l}$  lipofectamine (Gibco BRL) 按产品说明书转染 BHK 细胞 ( $2 \times 10^6$ ), 24h 后换成含 2% 胎牛血清的 1640 液 37℃ 培养。2-3 天后, 在光镜下可观察到噬斑出现并随时间而增大增多。5 天后, 80% 以上的细胞病变(变大变圆)。将此时的细胞连同培养液一起于 -20℃ 和 37℃ 反复冻融 3 次, 1500 rpm 离心 10 分钟, 取 0.1ml 上清(其余分装保存于 -20℃ 备用)用于感染 80% 铺满的 BHK 细胞(约  $2 \times 10^6$ ), 24 小时后用 X-gal 染色液染色 30-60 分钟, 光镜下观察到大量蓝色噬斑。表明成功地获得了携带并表达 lacZ 基因的重组单纯疱疹病毒。

#### 4. HSV1-lacZ 病毒的纯化

用上述病毒上清经适当稀释后感染 BHK 细胞, 36h 后挑取的彼此分离良好的 12 个噬斑接种于 12 孔板的 BHK 细胞中进行扩增培养, 3d 后分别保留各孔上清。用 X-gal 液染色细胞。在 12 个噬斑中, 蓝染的有 7 个, 未被蓝染的 5 个。取蓝染的第 12 孔相应上清, 再进行一次空斑纯化后大量扩增。

本发明的 HSV1-lacZ100 病毒可用于 1) 作为研究神经传导的示踪剂; 2) 作为抗单纯疱疹病毒药物及其它抗病毒药物的靶病毒; 3) 作为 HSV1 扩增子载体研究中的辅助病毒以更灵敏地监测辅助病毒滴度变化。

本发明的 cos56-lacZ 粘粒可保存于 MAX Efficiency DH5  $\alpha$  (GIBCO BRL 公司产品) 株中。含 cos56-lacZ 粘粒的菌株命名为 MAX Efficiency DH5  $\alpha$  /cos56-lacZ, 在含 50—100  $\mu$ g/ml 氨苄青霉素的 LB 培养基(1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl)传代培养。

本发明的 HSV1-lacZ100 病毒可在 BHK 细胞或其它敏感细胞中传代培养。含有 HSV1-lacZ100 病毒的培养液或细胞反复冻融后的裂解液上清均可保存于 -20  $^{\circ}$ C 至 -70  $^{\circ}$ C。含有 HSV1-lacZ100 病毒的培养上清已于 1998 年 4 月 30 日保存于中国微生物菌种保藏管理委员会微生物中心, 登记入册的编号为: 0348

以下实施例对本发明的 HSV1-lacZ100 的制备和用途作了详细说明, 但不意味着限制本发明的内容。

#### 实施例 1

##### HSV1-lacZ100 病毒的滴度测定

在 6 孔板中接种  $1 \times 10^6$ /孔 BHK 细胞, 37  $^{\circ}$ C 培养 24h。换液, 每孔加 1ml 培养液。在第 1 孔中加入 100  $\mu$ l 上述上清液, 混匀后取 100  $\mu$ l 加入第 2 孔中, 再取出 100  $\mu$ l 加入第 3 孔中, 依次进行 1:10 稀释。37  $^{\circ}$ C 培养 3 小时后, 弃去各孔中培养液, 加覆盖液(含有 1.5% 甲基纤维素及 2% 胎牛血清的 Eagle's 培养液) 5ml/孔, 37  $^{\circ}$ C 培养 3 天。弃去培养液, 用 PBS 缓冲液洗细胞 3 次, 用含 2% 甲醛和 0.2% 戊二醛的 PBS 缓冲液于 4  $^{\circ}$ C 固定细胞 5 分钟后用 PBS 缓冲液洗 1 次, 加 X-gal 染色液(含 1mg/ml X-gal, 5mmol/L 铁氰化钾, 5mmol/L 亚铁氰化钾, 2mmol/L MgCl<sub>2</sub> 的 PBS 缓冲液)覆盖细胞。30-60 分钟后观察并计数蓝斑数。计数第 5 孔及第 6 孔蓝斑数分别为 20 和 4 个(1 至 4 孔中蓝斑均过密, 难以计数)。由此计算 HSV1-lacZ 的滴度为  $2-4 \times 10^6$  pfu/ml。

#### 实施例 2

##### HSV1-lacZ100 病毒的传代

将经 2 次空斑纯化的 HSV1-lacZ100 连续在 BHK 细胞上传 5 代, 检测该重组病毒感染的蓝斑率仍为 100%, 表明获得的 HSV-lacZ100 病毒可稳定传代。

#### 实施例 3

##### HSV1-lacZ100 病毒感染其它细胞

用 HSV1-lacZ100 病毒(moi=0.1~1)感染培养的 Vero 细胞, HeLa 细胞, Wish 细胞, A549 细胞, 37  $^{\circ}$ C 培养 24h 后用 X-gal 检测, 均可观察到大量蓝染的细胞。说明该病毒在体外对多种细胞具有感染性, 并表达 lacZ 基因。

#### 实施例 4

##### 用 HSV1-lacZ100 初步检测 V-H<sup>+</sup>ATP 酶抑制剂 ConA 的抗病毒作用

V-H<sup>+</sup>ATP 酶抑制剂 ConA 由中国医学科学院医药生物技术所病毒室研制和提供。该

制剂浓度为 625 $\mu$ mol/L(50 % DMSO 中)。本实验用 HSV1-lacZ100 病毒感染 BHK 细胞为模型, 初步观察了 ConA 的抗单纯疱疹病毒作用。

在 6 孔板中等量接种 BHK 细胞, 27 $^{\circ}$ C 培养过夜, 使用前细胞约 80 % 铺满。用 1640 完全培养液(含 10 % FBS)将 ConA 分别稀释至终浓度为 5 $\mu$ mol/L, 1 $\mu$ mol/L, 200nmol/L, 40nmol/L, 8nmol/L。弃去培养液, 1, 2, 3, 4, 5 孔依次加入上述浓度的 ConA 液 2ml, 第 6 孔加不含 ConA 的培养液。37 $^{\circ}$ C 培养 2h, 每孔加入 100 $\mu$ l HSV1-lacZ100 病毒液(约  $10^6$  pfu/ml), 37 $^{\circ}$ C 培养 24h。弃去培养液, 用 PBS 液洗细胞 3 次, 加固定液(2% 甲醛, 0.2% 戊二醛, PBS 液中)于 4 $^{\circ}$ C 固定 5min, 弃去固定液, 用 PBS 液洗一次。加 X-gal 溶液(5mmol/L 铁氰化钾, 5mmol/L 亚铁氰化钾, 2mmol/L  $MgCl_2$ , X-gal 1mg/ml)37 $^{\circ}$ C 覆盖 1h。肉眼观察见第 5 孔和第 6 孔出现密集的蓝斑, 而 1, 2, 3, 4 孔均不明显。在倒置显微镜下观察, 见第 5 孔和第 6 孔中细胞成片蓝染, 而 1, 2, 3, 4 孔中细胞多为单个细胞蓝染。该结果提示浓度 40nmol/L 至 5 $\mu$ mol/L 的 ConA 可明显抑制 HSV1 病毒的复制, 浓度为 8nmol/L 的 ConA 已基本没有抑制作用。结果表明 ConA 对病毒的产毒性复制有明显的抑制作用, 其作用机理正在研究中。

用 HSV1-lacZ100 代替野生型 HSV-1 研究药物的抗病毒作用的特点是, 可通过 lacZ 基因表达产物的显色反应使结果观察和判断更敏感和客观。